



# PATENTSCHRIFT 25156

WP 12 o / 80 028

Patentart: Deutsches Wirtschaftspatent

Anmeldetag: 12. März 1959

Tag der Ausgabe der Patentschrift: 22. April 1963

AMT FÜR ERFINDUNGS-  
UND PATENTWESEN

Erfinder Dr. Ulrich Behrens, Leipzig  
zugleich Dr. Manfred Ringpfeil, Leipzig  
Inhaber: Anton Gabert, Leipzig

## Verfahren zur Herstellung von Dextran-Derivaten

1

Die Erfindung betrifft die Herstellung von Schwefelsäureestern der Ätheralkylcarbonsäuredextrane, wie Carboxymethyl-, Carboxyäthyl- und Carboxypropyldextran, die bei einem beträchtlich niedrigeren Schwefelgehalt als analoge Schwefelsäureester starke heparinoide Wirkung aufweisen.

Es ist bekannt, daß Polysaccharid-Polyschwefelsäureester blutgerinnungshemmende Wirkung besitzen. Es ist ferner bekannt, daß die meisten dieser Stoffe so toxisch sind, daß sie therapeutisch nicht verwendet werden können.

Ein Polysaccharid-Polyschwefelsäureester ist um so wirksamer, je höher sein Molekulargewicht (Kohlenhydratkette) und je höher sein Schwefelgehalt ist. Die Toxizität erhöht sich bei synthetischen Präparaten analog: Je höher das Molekulargewicht und je höher der Schwefelgehalt, desto toxischer das Präparat. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die Toxizität durch Einhalten eines bestimmten, relativ niedrigen Molekulargewichtsbereiches zu eliminieren. Es sind Verfahren bekannt, bei denen durch bestimmte methodische Maßnahmen ein Molekulargewicht des Dextransulfats von vorzugsweise 7500 erreicht wird.

An der Cellulose wurde gefunden, daß die Toxizität ihrer Schwefelsäureester durch Einführung von Carboxymethylgruppen und  $\beta$ -Oxyäthylgruppen vermindert werden kann.

Alle diese Verfahren haben die Tendenz, die heparinoide Wirksamkeit durch Einhalten eines optimalen Schwefelgehaltes zu gewährleisten und die damit verbundene Toxizität durch andere Maßnahmen, nämlich Senkung des Molekulargewichtes oder Einführung

2

von Carboxymethyl- bzw.  $\beta$ -Oxyäthylgruppen, zu verringern.

Die, wenn auch geringe, Hemmwirkung neutraler Polysaccharide auf die Gerinnung und ihre mögliche

5 Verstärkung durch andere saure Gruppen als  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen fand bisher in dem hier interessierenden Zusammenhang noch keine Beachtung. Aus der Anwendungspraxis von klinischem Dextran, besonders bei postoperativen Indikationen, ist bekannt geworden, daß die Blutungszeit auffallenderweise verlängert wird. Diese Erscheinung ist für Dextraninfusionslösungen charakteristisch.

Bei der Überprüfung dieses Phänomens fanden wir überraschenderweise, daß es durch Einführung von Carboxyalkylgruppen in das Dextranmolekül erhöht wird.

Bei der Kombination dieses Effektes mit der bekannten blutgerinnungshemmenden Wirkung von Dextransulfaten wurden völlig neuartige Erscheinungen entdeckt, die darauf beruhen, daß erfindungsgemäß hergestellte Carboxyalkyldextran-Polyschwefelsäureester mit einem unvergleichlich niederen Schwefelgehalt als analog hergestellte Dextranpolyschwefelsäureester gleichwertig starke heparinoide Wirksamkeit wie diese ausüben.

25 Dadurch wird ein nicht bekannter Weg der Herstellung von Polysaccharid-Polyschwefelsäureestern mit heparinoider Wirkung beschritten. Im spezifischen Falle des Dextrans läßt sich die schwefelenthaltende Komponente, die  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppe, wesentlich verringern und somit die ihr zugeschriebene toxische Wirkung. Der damit verbundene Verlust an gerinnungs-

3

hemmender Wirksamkeit läßt sich durch Einführung von sauren Gruppen, wie Carboxymethyl-, Carboxy-äthyl- und Carboxypropylgruppen, ausgleichen.

In den beigefügten Kurven sind Ergebnisse dieser Substitution von  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen durch saure Gruppen hinsichtlich der Recalcifizierungszeit am Humanplasma dargestellt. Es handelt sich bei diesem Vergleich um zwei Gruppen von Derivaten. Die beiden Gruppen werden jeweils aus den gleichen Ausgangsmaterialien (Dextran) hergestellt. Bei der ersten Gruppe wurde höher-molekulares Dextran (mittleres Molekulargewicht 75 000), bei der zweiten Gruppe niedermolekulares Dextran (mittleres Molekulargewicht 30 000) verwendet. Es geht aus den Kurven klar hervor, daß der Verlust an Schwefel durch die Einführung der sauren Carboxymethylgruppen kompensiert bzw. überkompensiert wird.

Bei der ersten Gruppe enthält das Carboxymethyldextransulfat 34,9 % Schwefel weniger als das entsprechende Dextransulfat; bei der zweiten Gruppe enthält das Carboxymethyldextransulfat 33,7 % Schwefel weniger als das entsprechende Dextransulfat. Der Substitutionsgrad  $\beta$  (für  $\text{COOH}$ -Gruppen) liegt beim ersten Carboxymethyldextransulfat  $\beta = 0,471$ , beim zweiten Carboxymethyldextransulfat ist  $\beta = 0,503$ . Analoge Ergebnisse wurden bei der Messung der Thrombinzeit gefunden. Alle diese Produkte erwiesen sich als nicht toxisch. Der Schwefelgehalt der erfindungsgemäß hergestellten Präparate liegt mindestens um  $\frac{1}{3}$  niedriger als der der bekannten wirksamen Präparate.

Es gibt zwei Wege für die Darstellung der genannten Präparate. Man kann die Carboxyalkylierung des Dextrans durchführen und anschließend sulfurieren; es kann aber auch der umgekehrte Weg beschritten werden, daß man erst die Sulfurierung und dann die Carboxymethylierung durchführt.

#### Beispiel 1:

##### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 75 000) werden mit 630 ml dest. Wasser angerührt, 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und so lange nachgerührt, bis sich das Dextran vollständig gelöst hat. Danach werden unter Rühren portionsweise 300 g Monochloressigsäure eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches darf dabei nicht über 20 °C ansteigen. Man läßt den Ansatz über Nacht stehen und fällt dann mit Methanol das Carboxymethyldextran-Natrium aus. Das Produkt wird durch mehrfaches Umfällen gereinigt. Man erhält 255 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad  $\beta = 0,471$ .

Zu 800 ml absolutem Pyridin werden unter Rührung und Kühlung mit Methanol-Kohlensäure 180 ml Chlorsulfonsäure getropft. Örtliche Überhitzungen, kenntlich durch Verfärbung der gebildeten Pyridiniumsalze, wurden vermieden. Nach Entfernung des Kühlbades werden die ausgeschiedenen Pyridinium-

4

salze durch Erwärmen auf 60 bis 70 °C größtenteils in Lösung gebracht.

Jetzt werden 120 g des getrockneten, fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums unter Rühren eingetragen, die Temperatur auf 75 bis 80 °C erhöht und unter Rühren 4 Stunden beibehalten. Man läßt das Reaktionsgemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen und rührt die Reaktionsmasse in 1 l Eiswasser ein. Die Pyridiniumsalze werden durch Zugabe von 40%iger Natronlauge zersetzt, das abgeschiedene Pyridin wird abgetrennt, das Natriumsalz des Carboxymethyldextransulfats wird mit Methanol gefällt, mehrfach umgefällt und dann der Dialyse unterworfen. Das Dialysat wird bei 40 bis 50 °C im Vakuum bis zur sirupösen Konsistenz eingedampft, in Methanol eingeführt, unter Methanol gegebenenfalls zerkleinert, mit Aceton und Äther gewaschen und anschließend getrocknet. Ausbeute des Natriumsalzes 160 g. Der Schwefelgehalt beträgt 10,8 %, bezogen auf das Natriumsalz.

#### Beispiel 2:

##### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 75 000) werden mit 630 ml dest. Wasser angerührt, 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und so lange gerührt, bis sich alles Dextran gelöst hat. Danach werden portionsweise 300 g Monochloressigsäure eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches darf dabei nicht über 20 °C steigen. Man läßt den Ansatz drei Tage bei Zimmertemperatur stehen und fällt dann das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus. Das Produkt wird durch mehrfaches Umfällen gereinigt. Man erhält 360 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad  $\beta = 0,693$ .

Aus 800 ml absolutem Pyridin und 180 ml Chlorsulfonsäure wird analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70 °C größtenteils gelösten Pyridiniumsalze werden 120 g des obigen getrockneten und fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums eingetragen und 4 Stunden bei 75 bis 80 °C sulfuriert. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes sowie dessen Reinigung erfolgt analog Beispiel 1. Man erhält 150 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 10,4 %.

#### Beispiel 3:

##### Herstellung von Carboxymethyldextransulfat-Natrium

200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 30 000) werden mit 630 ml dest. Wasser angerührt, 630 ml 40%ige Natronlauge zugesetzt und bis zur Lösung des Dextrans gerührt. Nachdem sich alles Dextran gelöst hat, werden 300 g Monochloressigsäure portionsweise eingetragen, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches nicht über 20 °C steigen darf. Man läßt den Ansatz über Nacht stehen, fällt das gebildete Carboxymethyldextran-Natrium mit Methanol aus und reinigt es durch mehrfaches Umfällen. Man erhält

5

260 g des Natriumsalzes mit einem Substitutionsgrad  $\beta = 0,560$ .

Aus 800 ml absolutem Pyridin und 180 ml Chlorsulfonsäure wird analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70 °C größtenteils in Lösung gebrachten Pyridiniumsalze werden 120 g des obigen getrockneten und fein pulverisierten Carboxymethyldextran-Natriums eingetragen und 4 Stunden bei 75 bis 80 °C sulfuriert. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes erfolgt analog Beispiel 1. Man erhält 130 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 10,76 %.

#### Beispiel 4:

##### Herstellung von Carboxypropyldextransulfat-Natrium

200 g Dextran (mittleres Molekulargewicht 13 000) werden mit 644 ml dest. Wasser angerührt und mit 644 ml 40%iger Natronlauge versetzt. Nachdem das Dextran unter Rühren vollständig in Lösung gebracht wurde, wurden 628 g  $\gamma$ -Brombuttersäure portionsweise eingetragen. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wurde auf unter 20 °C gehalten. Man läßt den Ansatz einen Tag stehen und fällt das gebildete Carboxypropyldextran-Natrium mit Methanol aus

6

und reinigt es durch mehrfaches Umfällen. Ausbeute: 110 g des Natriumsalzes.

Aus 685 ml absolutem Pyridin und 150 ml Chlorsulfonsäure wurde analog Beispiel 1 das Pyridiniumsulfurierungsgemisch hergestellt. In die bei 60 bis 70 °C größtenteils in Lösung gebrachten Pyridiniumsalze wurden 100 g des obigen getrockneten und fein pulverisierten Carboxypropyldextran-Natriums eingerührt und anschließend 4 Stunden bei 75 bis 80 °C sulfuriert. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches sowie dessen Reinigung erfolgt analog Beispiel 1. Man erhält 60 g des Natriumsalzes mit einem Schwefelgehalt von 11,3 %.

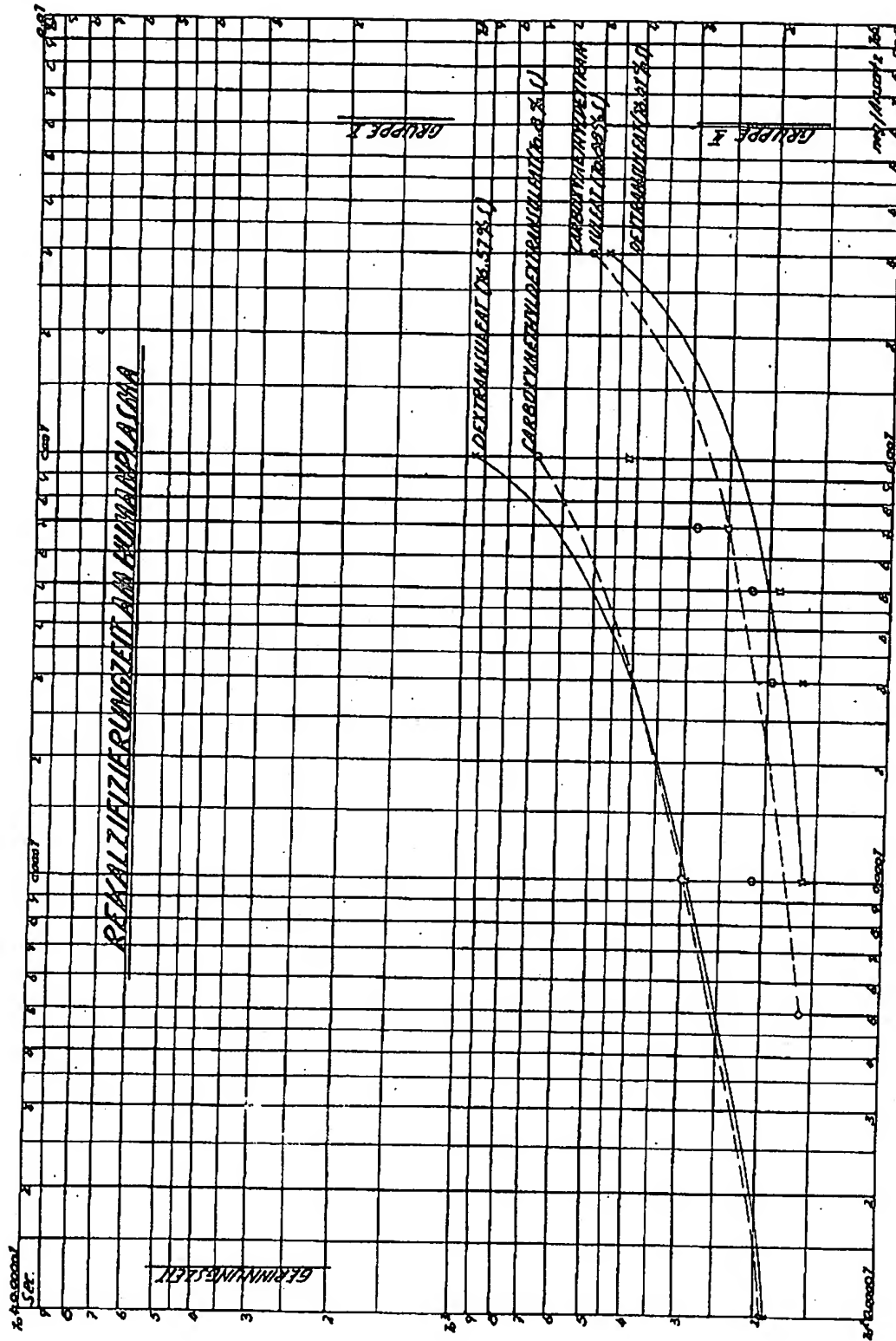
#### Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Dextranderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß Dextrane sowohl im Molekularbereich von 10 000 bis 250 000 mit  $\text{HSO}_3$ -abspaltenden Mitteln verestert als auch mit Carboxyalkylhalogeniden veräthert werden, so daß der Schwefelgehalt maximal 11,3 %, bezogen auf das Natriumsalz, beträgt, durch Ersatz eines Teiles der toxisch wirkenden  $\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen durch nicht toxische Carboxyalkyl-Gruppen ohne Abfall der antikoagulierenden Wirksamkeit.

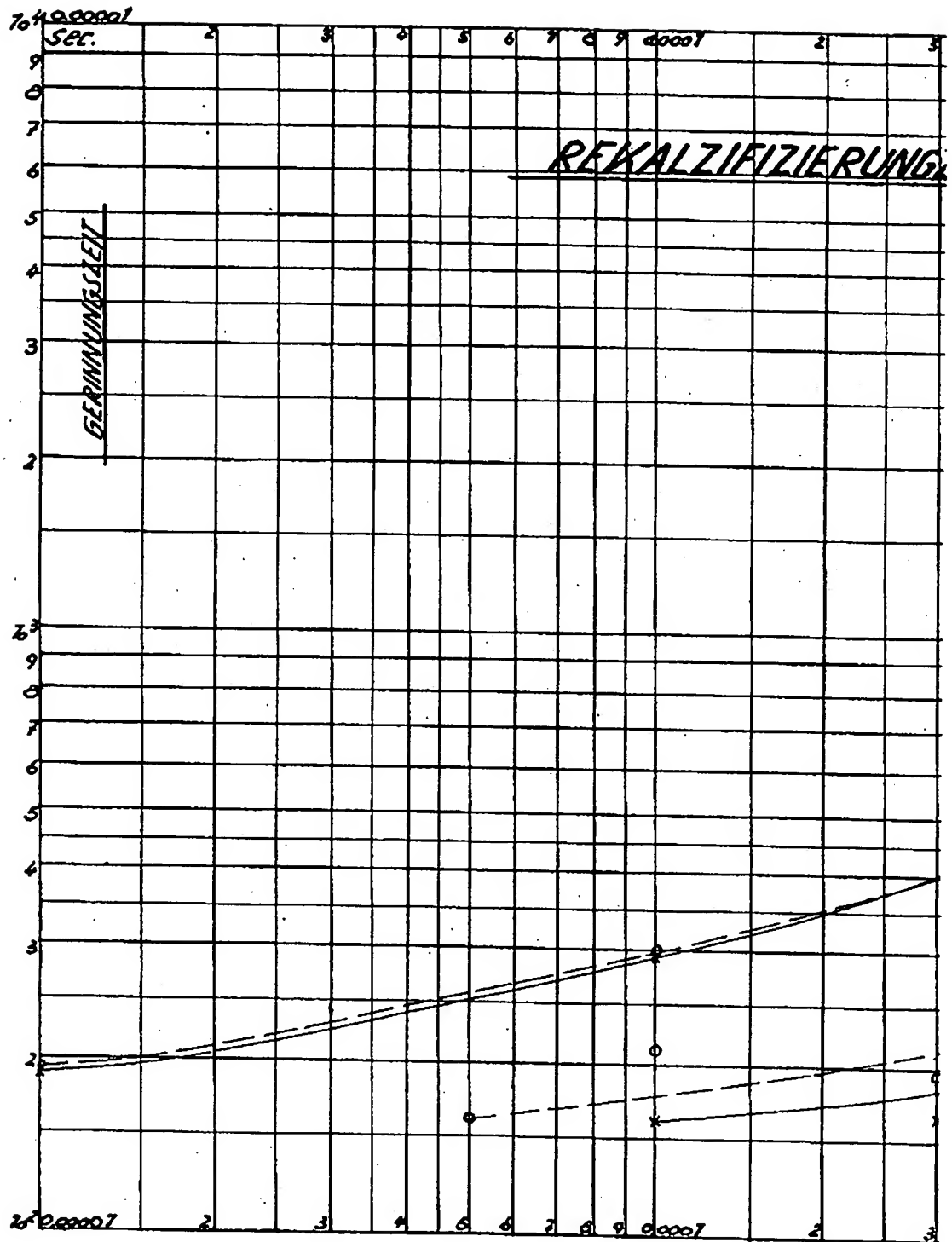
Hierzu 2 Blatt Zeichnungen

25156  
KL 130 6

25156  
KL 130 6



25156  
Kl. 12o 6



25 156

KL 120 6

